

Válasz Dr. Kocsy Gábor opponensi véleményére

Köszönöm Opponensemnek, hogy időt és fáradságot nem sajnálva elmélyült MTA doktora értekezésem gondolatmenetének, kérdésfeltevéseinek, a benne leírt kísérleti rendszereknek, eredményeimnek és az azokból levont következtetéseknek a megértésében.

Opponensem (Dr. Pál Magda véleményével összhangban) jogosan hiányolta értekezésemből a rövidítések jegyzékét, és szintén indokolt a doktori mű ábráinak színvonalát minősítő bírálata.

Kalászos gabonafélék hidegedzésére irányuló kísérleteimmel összefüggésben szintén jogosan jegyzi meg Sutka József és Galiba Gábor közleményeire való hivatkozásaim hiányát, ezt mindenképp célszerű lett volna beépítenem az irodalmi háttér feldolgozásába (Sutka és mtsai 1999, Galiba és mtsai 1997).

Sutka, J., Galiba, G., Vágújfalvi, A., Gill, B. S., & Snape, J. W. (1999). Physical mapping of the Vrn-A1 and Fr1 genes on chromosome 5A of wheat using deletion lines. Theoretical and Applied Genetics, 99, 199-202.

Galiba, G., Kerepesi, I., Snape, J. W., & Sutka, J. (1997). Location of a gene regulating cold-induced carbohydrate production on chromosome 5A of wheat. Theoretical and Applied Genetics, 95, 265-270.

A doktori mű 13. oldalán a kórokozó gombák 7. alcsoportja - életmód szerinti felosztás alapján - a **vaszkulartróf** gombák alcsoportja.

Milyen szempontok alapján választottuk ki az RBOHD fehérje 11 perspektivikus kölcsönható partnerét?

Az Arabidopsis Interactions Viewer alkalmazás és adatbázis 55 olyan fehérjét tartalmaz, melyek élesztő két hibrid vizsgálat alapján fizikai kölcsönhatást létesítenek az RBOHD fehérjével. Ebből a listából választottunk ki 11 fehérjét, melyek szerepére vonatkozóan korábban nem volt ismert az RBOHD fehérjével való funkcionális kapcsolat. Használhattuk volna a saját microarray elemzésünk során előkerült fehérjéket kódoló gének listáját is, ezeknek a faktoroknak egy része azonban már meglehetősen jól jellemzett (pl. ACS6, PR1, WRKY6, WRKY40, Cu/Zn SOD). Másrészt több lehetőséget láttunk egy olyan *Arabidopsis* fehérje lista tagjainak a közelebbi vizsgálatában, melyeknél az RBOHD-vel fellépő fizikai kölcsönhatás már valószínűsíthető.

Van-e irodalmi adat arra, hogy az aszúsodás miként befolyásolja az aszkorbát-glutation ciklus enzimeinek aktivitását?

Nem olvastam még ilyen közleményt, ami nemesrothadt szőlőbogyók és az aszkorbát-glutation ciklus enzimeinek aktivitása kérdést vizsgálta volna. Szürkerothadás kapcsán hozzáférhető több dolgozat is, én az alábbiakat találtam a teljesség igénye nélkül:

Rahman és mtsai (2020): Histochemical and microscopic studies predict that grapevine genotype "Ju mei gui" is highly hesistant against Botrytis cinerea. Pathogens, 253.

Karakus és mtsai (2021) Nepeta meyeri essential oil ameliorates fungal infection and the antioxidant response in grapevines (Vitis vinifera) infections by gray mold (Botrytis cinerea). Acta Physiologiae Plantarum 43, 151.

Kritzinger és mtsai (2013) Role of Glutathione in Winemaking: A Review. Journal of Agricultural and Food Chemistry 61, 269–277.

Opponensem három kérdésére az alábbi válaszokat adom:

Alakulhatnak-e ki a reaktív oxigén-származékok eltérő mértékű képződése miatt koncentráció-gradiensek a sejtekben és a szövetekben a kórokozó gomba és a növény kölcsönhatása során és ezeknek mi lehet a szerepe?

A növényi redox biológia általam követett vezető szakértői a ROS hírvivő, jelátvivő szerepével kapcsolatban egyöntetűen olyan jellegű modellekben gondolkodnak, melyekben a különböző reaktív oxigén származékok a növényi sejt különféle sejtalkotóiban (citoplazma, kloroplasztizsok, mitokondriumok, sejtmag, peroxiszómák, endoplazmatikus retikulum, sejtközi járatok) precízen szabályozott és gyakran változó koncentrációkban járulnak hozzá a sejt és a szövetek redox homeosztázisának fenntartásához (Mittler és mtsai 2022).

Ha figyelembe vesszük a növényi sejt ROS termelő folyamatainak a komplexitását és a reaktív oxigén származékokat ellensúlyozó antioxidáns rendszerek sokféleségét, ez szintén arra utal, hogy a reaktív oxigén származékok koncentrációját a sejt többféle tartományban és nagy pontossággal képes szabályozni.

A ROS koncentráció-gradiensek vizsgálatát azonban jelentősen megnehezíti a különböző reaktív oxigén származékok mennyiségének megbízható mérése. Ez különösen igaz azokra a helyzetekre, amikor a sejten belül az egyes sejtalkotókban kéne a mennyiségüket meghatározni (Noctor és mtsai 2016, Waszczak és mtsai 2018).

A szalicilsav (SA) szöveti koncentrációja és az általa szabályozott NPR1 redox szenzor aktivitása összefügghet a feltételezett ROS gradiensek működésével (Zavaliev és mtsai 2020).

Ugyan nem közvetlenül a ROS mennyiségét méri, azonban a sejtek redox egyensúlyának mennyiségi vizsgálatában hasznos lehet a redukált és oxidált glutation (GR/GSSH) arányának LC-MS meghatározása (Pastor és mtsai 2013).

Mittler, Zandalinas, Fichman és Van Breusegem (2022): Reactive oxygen species (ROS) signalling in plant stress responses. Nature Reviews Molecular Cell Biology 23, 663–679.

Waszczak, Carmody és Kangasjärvi (2018): Reactive oxygen species in plant signaling. Annual Review of Plant Biology 69, 209–236.

Noctor, Mhamdi és Foyer (2016) Oxidative stress and antioxidative systems: recipes for successful data collection and interpretation. Plant, Cell and Environment 39, 1140–1160.

Zavaliev, Mohan, Chen és Dong (2020): Formation of NPR1 condensates promotes cell survival during the plant immune response. Cell 182, 1093–1108.

Pastor, Luna, Ton, Cerezo, García-Agustín és Flors (2013): Fine tuning of reactive oxygen species homeostasis regulates primed immune responses in *Arabidopsis*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 26, 1334–1344.

Hogy vehetnek részt a kis RNS-ek és az RNS interferencia-mechanizmusok a növényi sejtek kórokozó gombákkal szembeni védekezésében?

A növényi sejt-kórokozó gomba kölcsönhatások molekuláris biológiai vizsgálata változatos és szerteágazó felfedezéseket eredményezett az epigenetikai szabályozás különböző eseteire vonatkozóan. Találunk számos példát transzkripció és poszt-transzkripció szintű szabályozásra. Transzkripció géncsendesítés négy eltérő típusát azonosították *Arabidopsis* növények védekezése során *Botrytis* és *Alternaria* nekrotróf gombakórokozók támadására adott válaszként. Egyrészt a kis RNS-ek által közvetített DNS metilációban fontos szerepet játszó RNS polimeráz V fehérje szerepének fontosságát igazolták a *Botrytis* elleni növényi ellenállóságban (López és mtsai 2011). Feltártak emellett három másik transzkripció géncsendesítést eredményező molekuláris folyamatot, ami nem közvetlenül a DNS metilációján keresztül valósul meg, hanem a kromatin hisztonfehérjéinek deacetilációjával, metilációjával és ubikvitinációjával következik be. Ezek a kromatin átrendeződést eredményező hiszton módosulások génkifejeződésre gyakorolt szabályozó hatása elősegíti a növény nekrotróf gombakórokozókkal szembeni ellenállóságát (Zhou és mtsai 2005, Berr és mtsai 2010, Dhawan és mtsai 2009).

Transzkripció szintű géncsendesítés mellett nagyon sok példát találunk poszt-transzkripció gén csendesítési jelenségekre is a növények kórokozó gombákkal szembeni védekező eszköztárában. A növény által termelt nem-kódoló RNS-ek poszt-transzkripció célpontjai lehetnek a növény saját hírvivő RNS molekulái. Erre példa az *Arabidopsis* miR773, ami a *metil-transzferáz 2 (MET2)* mRNS mennyiségét szabályozza a növényi sejtek citoplazmájában, ami jelentősen módosítja a növény általános rezisztenciáját és fogékonyságát nekrotróf és hemibiotróf gombakórokozókkal (*Plectosphaerella cucumerina*, *Colletotrichum higginsianum*) szemben (Salvador-Guirao és mtsai 2018). A növény nem-kódoló RNS molekulái bejuthatnak a kórokozó gomba sejtekbe is, ott is lehetnek mRNS célpontjai, ilyenkor fajok-közötti (trans-species) géncsendesítés következik be (Hudzik és mtsai 2020). Nem-kódoló RNS molekulák gazdanövényből a kórokozó gomba sejtjeibe való átjutás jelenségét kihasználó géntechnológiai eljárás remek példája a gazda-eredetű géncsendesítés (Host-Induced Gene Silencing vagy HIGS). Erre jó példa a *Fusarium graminearum* kórokozó gomba ergoszterol bioszintéziséért felelős CYP51 fehérjét kódoló három paralóg gén szekvenciáját szensz- és antiszensz irányban kifejező stabil transzformáns *Arabidopsis* és árpa növények, melyek a gomba CYP51 szekvenciáit kettős szálú RNS formájában termelik, ellenállóak a *F. graminearum* fertőzésével szemben, a kontroll növények ugyanakkor fogékonyak a kórokozó iránt (Koch és mtsai 2013).

López, Ramírez, García-Andrade, Flors és Vera (2011): The RNA silencing enzyme RNA polymerase V is required for plant immunity. *PLoS Genetics* 7, e1002434.

Dhawan, Luo, Förster, Abuqamar, Du, Briggs, Mittelsten Scheid és Mengiste (2009): HISTONE MONOUBIQUITINATION1 interacts with a subunit of the mediator complex and regulates defense against necrotrophic fungal pathogens in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 21, 1000- 1019.

Zhou, Zhang, Duan, Miki és Wu (2005): HISTONE DEACETYLASE19 is involved in jasmonic acid and ethylene signaling of pathogen response in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 17, 1196- 1204.

Berr, McCallum, Alioua, Heintz, Heitz és Shen (2010): *Arabidopsis* histone methyltransferase SET DOMAIN GROUP8 mediates induction of the jasmonate/ethylene pathway genes in plant defense response to necrotrophic fungi. *Plant Physiology* 154, 1403-1414.

Salvador-Guirao, Baldrich, Weigel, Rubio-Somoza és San Segundo (2018): The MicroRNA miR773 Is Involved in the *Arabidopsis* Immune Response to Fungal Pathogens. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 31, 249-259.

Hudzik, Hou, Ma és Axtell (2020): Exchange of small regulatory RNAs between plants and their pests. *Plant Physiology* 182, 51–62.

Koch, Kumar, Weber, Keller, Imani és Kogel (2013): Host-induced gene silencing of cytochrome P450 lanosterol C14 α -demethylase–encoding genes confers strong resistance to *Fusarium* species. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110, 19324-19329.

Megvalósult-e már a nemesrothadás kontrollált előidézésével kapcsolatos eredmények gyakorlati alkalmazása?

Egy alkalommal volt idáig lehetőségem a módszer kipróbálására ültetvényben. Kétezer-húsz novemberének első két hetében. Ez egy hűvös, csapadékos időjárású ősz volt Tokaj-Hegyalján. Azt sikerült igazolnunk a kísérlettel, hogy laboratóriumban, táptalajon felszaporított *Botrytis* konídiumszuszpenziót kipermetezve az ültetvényben lévő fűrtökre javítható a bogyókon kifejlődő botritizáció mértéke. Az aszúsodásnak egyáltalán nem kedvező, tipikus szürkerothadásos időjárású két hétben folytattam a kísérletet, melynek látszólag nem volt nagyon hasznos az eredménye: az eleve szürkerothadással sújtott fűrtökön sikerült még erősebb szürkerothadásos tüneteket előidézni. Azonban a legfontosabb kérdést sikerült ezzel tisztáznunk, ez pedig az volt, hogy a mesterségesen felszaporított fertőzőképletek kijuttatásával ténylegesen fokozni lehet a *Botrytis* által megfertőzött szőlőbogyók mennyiségét ültetvényi körülmények között is. Nemesrothadást ebben az évben, az említett időjárású körülmények között csak úgy tudtunk volna előidézni, ha a fűrtöket fertőzés után begyűjtjük, és azokat szabályozott, alacsonyabb páratartalmú zárt helyiségben inkubáljuk. Ennek a módszernek a hatásosságát már igazoltuk a két évvel korábbi martonvásári kísérletünkben.

Köszönöm végül opponensem támogató állásfoglalását MTA doktora értekezésemmel kapcsolatban!

University Park, 2023. augusztus 20.



Dr. Pogány Miklós

tudományos főmunkatárs

ATK Növényvédelmi Intézet